

Rec'd PCT/PTO 26 JAN 2005

PCT/JP03/04120

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

01.04.03

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日

Date of Application:

2002年 3月29日

出 願 番 号

Application Number:

特願2002-095486

[ST.10/C]:

[JP2002-095486]

出 願 人

Applicant(s):

セレスター・レキシコ・サイエンシズ株式会社
第一製薬株式会社

REC'D 23 MAY 2003

WIPO

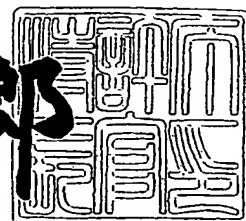
PCT

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 5月 9日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Japan Patent Office

太田信一郎



出証番号 出証特2003-3033415

【書類名】 特許願

【整理番号】 NP02-1028

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 A61K 38/17

【発明の名称】 c - J u n リン酸化阻害剤 (K I A A 0 5 9 6)

【請求項の数】 15

【発明者】

【住所又は居所】 千葉県千葉市美浜区中瀬 1 丁目 3 番地
幕張テクノガーデン D 棟 1 7 階
セレスター・レキシコ・サイエンシズ株式会社内

【氏名】 土居 洋文

【発明者】

【住所又は居所】 東京都江戸川区北葛西 1 丁目 1 6 番 1 3 号
第一製薬株式会社 東京研究開発センター内

【氏名】 和田 直也

【発明者】

【住所又は居所】 東京都江戸川区北葛西 1 丁目 1 6 番 1 3 号
第一製薬株式会社 東京研究開発センター内

【氏名】 中島 弘人

【特許出願人】

【識別番号】 500520628

【氏名又は名称】 セレスター・レキシコ・サイエンシズ株式会社

【特許出願人】

【識別番号】 000002831

【氏名又は名称】 第一製薬株式会社

【代理人】

【識別番号】 100088904

【弁理士】

【氏名又は名称】 庄司 隆

【電話番号】 03-3864-6572

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 067070

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 c-Junリン酸化阻害剤 (K I A A 0 5 9 6)

【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記の群から選ばれる1または2以上のペプチドであってc-Jun N末端キナーゼ3と結合するペプチドからなるc-Jun N末端キナーゼ3によるc-Junのリン酸化阻害剤；

- ①配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるペプチド(A)、
- ②前記ペプチド(A)のアミノ酸配列のうち少なくとも5個の連続したアミノ酸残基からなるペプチド、
- ③前記ペプチド(A)と約70%以上の相同性を有するペプチド、
- ④前記①または②のペプチドのアミノ酸配列において1個ないし数個のアミノ酸の変異を有するペプチド、
- ⑤前記①から④のいずれかのペプチドを含有するペプチド、

および

- ⑥配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列からなるペプチド。

【請求項2】 下記の群から選ばれる1または2以上のペプチドであってc-Jun N末端キナーゼ3と結合するペプチドを用いることを特徴とするc-Jun N末端キナーゼ3によるc-Junのリン酸化の阻害方法；

- ①配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるペプチド(A)、
- ②前記ペプチド(A)のアミノ酸配列のうち少なくとも5個の連続したアミノ酸残基からなるペプチド、
- ③前記ペプチド(A)と約70%以上の相同性を有するペプチド、
- ④前記①または②のペプチドのアミノ酸配列において1個ないし数個のアミノ酸の変異を有するペプチド、
- ⑤前記①から④のいずれかのペプチドを含有するペプチド、

および

- ⑥配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列からなるペプチド。

【請求項3】 請求項1に記載のリン酸化阻害剤からなるc-Junの転写活性化能の阻害剤。

【請求項4】 下記の群から選ばれる1または2以上のペプチドであって c-Jun N末端キナーゼ3と結合するペプチドにより c-Jun N末端キナーゼ3による c-Junのリン酸化を阻害することを特徴とする c-Junの転写活性化能の阻害方法；

- ①配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるペプチド(A)、
 - ②前記ペプチド(A)のアミノ酸配列のうち少なくとも5個の連続したアミノ酸残基からなるペプチド、
 - ③前記ペプチド(A)と約70%以上の相同性を有するペプチド、
 - ④前記①または②のペプチドのアミノ酸配列において1個ないし数個のアミノ酸の変異を有するペプチド、
 - ⑤前記①から④のいずれかのペプチドを含有するペプチド、
- および
- ⑥配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列からなるペプチド。

【請求項5】 請求項1に記載のリン酸化阻害剤、または請求項3に記載の転写活性化能の阻害剤を少なくとも1つ含有してなる医薬組成物。

【請求項6】 請求項5に記載の医薬組成物からなる、c-Jun N末端キナーゼ3による c-Junのリン酸化に基づく疾患の防止および／または治療剤。

【請求項7】 下記の群から選ばれる1または2以上のペプチドであって c-Jun N末端キナーゼ3と結合するペプチドを含んでなる、c-Jun N末端キナーゼ3による c-Junのリン酸化に基づく疾患の防止および／または治療剤；

- ①配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるペプチド(A)、
- ②前記ペプチド(A)のアミノ酸配列のうち少なくとも5個の連続したアミノ酸残基からなるペプチド、
- ③前記ペプチド(A)と約70%以上の相同性を有するペプチド、
- ④前記①または②のペプチドのアミノ酸配列において1個ないし数個のアミノ酸の変異を有するペプチド、
- ⑤前記①から④のいずれかのペプチドを含有するペプチド、

および

⑥配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列からなるペプチド。

【請求項8】 下記の群から選ばれる1または2以上のペプチドであって c-Jun N末端キナーゼ3と結合するペプチドをコードするポリヌクレオチドを含んでなる、c-Jun N末端キナーゼ3によるc-Junのリン酸化に基づく疾患の防止および/または治療剤；

①配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるペプチド(A)、

②前記ペプチド(A)のアミノ酸配列のうち少なくとも5個の連続したアミノ酸残基からなるペプチド、

③前記ペプチド(A)と約70%以上の相同性を有するペプチド、

④前記①または②のペプチドのアミノ酸配列において1個ないし数個のアミノ酸の変異を有するペプチド、

⑤前記①から④のいずれかのペプチドを含有するペプチド、

および

⑦配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列からなるペプチド。

【請求項9】 前記c-Jun N末端キナーゼ3によるc-Junのリン酸化に基づく疾患が神経変性疾患である請求項6から8のいずれか1項に記載の防止および/または治療剤。

【請求項10】 前記神経変性疾患がポリグルタミン病、ハンチントン病、脊髄小脳失調症、球脊髄性筋萎縮症、齒状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症、アルツハイマー病、ダウン症、パーキンソン病、Lewy小体型痴呆症、多系統萎縮症、家族性筋萎縮性側索硬化症、進行性核上性麻痺、皮質基底核変性症、pick病、ファミリーアルプリティッシュデメンチア(familial British dementia)、クロイツフェルトーヤコブ(Creutzfeldt-Jakob)病、ゲルストマンーストランスラー(Gerstmann-Strausler)症候群、狂牛病(ウシ海綿状脳症)(BSE)、またはニューロセルピン(neuroserpin)封入体を伴う家族性痴呆症である請求項9に記載の防止および/または治療剤。

【請求項11】 下記の群から選ばれる1または2以上のペプチドであって

c-Jun N末端キナーゼ3と結合するペプチドによりc-Jun N末端キナーゼ3によるc-Junのリン酸化を阻害することを特徴とするc-Jun N末端キナーゼ3によるc-Junのリン酸化に基づく疾患の防止および／または治療方法；

- ①配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるペプチド（A）、
 - ②前記ペプチド（A）のアミノ酸配列のうち少なくとも5個の連続したアミノ酸残基からなるペプチド、
 - ③前記ペプチド（A）と約70%以上の相同性を有するペプチド、
 - ④前記①または②のペプチドのアミノ酸配列において1個ないし数個のアミノ酸の変異を有するペプチド、
 - ⑤前記①から④のいずれかのペプチドを含有するペプチド、
- および
- ⑥配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列からなるペプチド。

【請求項12】 請求項5に記載の医薬組成物を用いることを特徴とするc-Jun N末端キナーゼ3によるc-Junのリン酸化に基づく疾患の防止および／または治療方法。

【請求項13】 下記の群から選ばれる1または2以上のペプチドであってc-Jun N末端キナーゼ3と結合するペプチドをコードするポリヌクレオチドを用いることを特徴とするc-Jun N末端キナーゼ3によるc-Junのリン酸化に基づく疾患の防止および／または治療方法；

- ①配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるペプチド（A）、
 - ②前記ペプチド（A）のアミノ酸配列のうち少なくとも5個の連続したアミノ酸残基からなるペプチド、
 - ③前記ペプチド（A）と約70%以上の相同性を有するペプチド、
 - ④前記①または②のペプチドのアミノ酸配列において1個ないし数個のアミノ酸の変異を有するペプチド、
 - ⑤前記①から④のいずれかのペプチドを含有するペプチド、
- および
- ⑥配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列からなるペプチド。

【請求項14】 前記 c-Jun N末端キナーゼ3 による c-Jun のリン酸化に基づく疾患が神経変性疾患である請求項11から13のいずれか1項に記載の防止および／または治療方法。

【請求項15】 前記神経変性疾患がポリグルタミン病、ハンチントン病、脊髄小脳失調症、球脊髄性筋萎縮症、歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症、アルツハイマー病、ダウン症、パーキンソン病、Lewy小体型痴呆症、多系統萎縮症、家族性筋萎縮性側索硬化症、進行性核上性麻痺、皮質基底核変性症、pick病、ファミリアル ブリティッシュ デメンチア (familial British dementia)、クロイツフェルトーヤコブ (Creutzfeldt-Jakob) 病、ゲルストマンーストランスラー (Gerstmann-Strausler) 症候群、狂牛病 (ウシ海綿状脳症) (BSE)、またはニューロセルピン (neuroserpin) 封入体を伴う家族性痴呆症である請求項14に記載の防止および／または治療方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】

本発明は、配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるペプチド (A)、または c-Jun N末端キナーゼ3 (以下、JNK3と略称する) と結合する下記ペプチド；ペプチド (A) のアミノ酸配列のうち少なくとも5個の連続したアミノ酸残基からなるペプチド；ペプチド (A) のアミノ酸配列において1個ないし数個のアミノ酸の変異を有するペプチド；ペプチド (A) と約70%以上の相同性を有するペプチド；上記ペプチドを含有するペプチド、例えば配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列からなるペプチド；により JNK3 による c-Jun のリン酸化を阻害することによる、c-Jun の機能抑制、例えば転写活性化能抑制；これを利用したアポトーシス抑制、例えば神経細胞のアポトーシス抑制；並びに神経変性疾患などの防止および／または治療；に用いる薬剤、医薬組成物およびその方法に関する。

【0002】

【従来技術】

c-Jun N末端キナーゼ（以下、JNKと略称する）は、MAPキナーゼスーパーファミリーの1つである。しかしながら、JNKは古典的MAPキナーゼ（ERK）とは異なり、増殖刺激ではほとんど活性化せず、細胞に対するストレス、例えばDNA損傷、紫外線、熱、高浸透圧、ERストレス、および活性酸素など並びに炎症性サイトカイン、例えば腫瘍壊死因子（TNF）やインターロイキン1など、により活性化する。

【0003】

JNKがストレス応答により活性化され、アポトーシスに参与することは、JNKの活性化が神経成長因子（NGF）除去による神経系細胞株PC12細胞の細胞死において観察されたことなどから、従来知られていた。近年、JNKがカスパーゼ（caspase）依存的なアポトーシスの調節に作用すること、またカスパーゼ非依存的にJNK依存的なアポトーシスが起こることが報告されている。さらに、哺乳類において病的（神経変性疾患）に起こる細胞死の多くが、カスパーゼ非依存的に起こることが明らかになってきた【北中 千史ら、Molecular medicine (2000) 37:408-418】。

【0004】

アポトーシスには転写依存的な細胞死（例えば神経栄養因子除去による交感神経死やDNA損傷による死）と、転写非依存的な細胞死（例えば紫外線照射による死やFasによる死）があるが、JNKは両方への関与が示唆されている。転写依存的な細胞死では、JNKがc-Junのアミノ酸配列中第63番目および第73番目のセリン（S）をリン酸化して活性化せしめることが認められている。例えば、c-Junのリン酸化部位をアラニン（A）に置換した変異体（A63、A73）のノックインマウスでは、カイニン酸投与による神経死が顕著に抑制された【Behrens, A. et al., Nature Genet. (1999) 21:326-329】。c-Junはトランスアクチベーターであり、遺伝子の発現制御部位に結合して、その遺伝子の転写を促進する転写活性化能を有する。したがって、c-Junはその下流でなんらかのアポトーシス促進因子、例えばBimおよびFasLなど、の転写を誘導すると予想されている。

【0005】

現在、哺乳類には3種類のJNK遺伝子、すなわちJNK1、JNK2、およびJNK3、が見い出されている。このうち、JNK3は脳神経系などに特異的に発現しており、低酸素状態などのショック的状态で発現して脳機能に障害を与えることが知られている。また、JNK3をノックアウトすると、カイニン酸投与による興奮性神経死が抑制されることが報告されている[Yang, D. D. et al., Nature (1997) 389: 865-870]。

【0006】

したがって、JNK3のシグナル経路を阻害することにより、JNK3のシグナル経路の異常によって引き起こされる疾患、例えば細胞のアポトーシスに基づく疾患、具体的には神経変性疾患など、の解明並びに防止および／または治療が可能になると考えられる。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の課題は、JNK3のシグナル経路を阻害する物質を見い出し、JNK3のシグナル経路の異常によって引き起こされる疾患、例えば細胞のアポトーシスに基づく疾患、具体的には神経変性疾患など、の防止および／または治療手段を提供しようとするものである。

【0008】

【課題解決のための手段】

上記課題を解決すべく本発明者らは鋭意努力し、JNK3と結合するペプチド(配列表の配列番号1)により、JNK3によるc-Junのリン酸化が阻害されることを見い出し、本発明を完成した。

【0009】

すなわち本発明は、

(1) 下記の群から選ばれる1または2以上のペプチドであってJNK3と結合するペプチドからなるJNK3によるc-Junのリン酸化阻害剤；

①配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるペプチド(A)、

②前記ペプチド(A)のアミノ酸配列のうち少なくとも5個の連続したアミノ酸残基からなるペプチド、

- ③前記ペプチド（A）と約70%以上の相同性を有するペプチド、
 - ④前記①または②のペプチドのアミノ酸配列において1個ないし数個のアミノ酸の変異を有するペプチド、
 - ⑤前記①から④のいずれかのペプチドを含有するペプチド、
- および

- ⑥配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列からなるペプチド、

（2） 下記の群から選ばれる1または2以上のペプチドであってJNK3と結合するペプチドを用いることを特徴とするJNK3によるc-Junのリン酸化の阻害方法；

- ①配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるペプチド（A）、
 - ②前記ペプチド（A）のアミノ酸配列のうち少なくとも5個の連続したアミノ酸残基からなるペプチド、
 - ③前記ペプチド（A）と約70%以上の相同性を有するペプチド、
 - ④前記①または②のペプチドのアミノ酸配列において1個ないし数個のアミノ酸の変異を有するペプチド、
 - ⑤前記①から④のいずれかのペプチドを含有するペプチド、
- および

- ⑥配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列からなるペプチド、

（3） 前記（1）のリン酸化阻害剤からなるc-Junの転写活性化能の阻害剤、

（4） 下記の群から選ばれる1または2以上のペプチドであってJNK3と結合するペプチドによりJNK3によるc-Junのリン酸化を阻害することを特徴とするc-Junの転写活性化能の阻害方法；

- ①配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるペプチド（A）、
- ②前記ペプチド（A）のアミノ酸配列のうち少なくとも5個の連続したアミノ酸残基からなるペプチド、
- ③前記ペプチド（A）と約70%以上の相同性を有するペプチド、
- ④前記①または②のペプチドのアミノ酸配列において1個ないし数個のアミノ酸の変異を有するペプチド、

⑤前記①から④のいずれかのペプチドを含有するペプチド、
および

⑥配列表の配列番号 2 に記載のアミノ酸配列からなるペプチド、

(5) 前記(1)のリン酸化阻害剤、または前記(3)の転写活性化能の阻害剤を少なくとも1つ含有してなる医薬組成物、

(6) 前記(5)の医薬組成物からなる、JNK3によるc-Junのリン酸化に基づく疾患の防止および／または治療剤、

(7) 下記の群から選ばれる1または2以上のペプチドであってJNK3と結合するペプチドを含んでなる、JNK3によるc-Junのリン酸化に基づく疾患の防止および／または治療剤；

①配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列からなるペプチド(A)、

②前記ペプチド(A)のアミノ酸配列のうち少なくとも5個の連続したアミノ酸残基からなるペプチド、

③前記ペプチド(A)と約70%以上の相同性を有するペプチド、

④前記①または②のペプチドのアミノ酸配列において1個ないし数個のアミノ酸の変異を有するペプチド、

⑤前記①から④のいずれかのペプチドを含有するペプチド、
および

⑥配列表の配列番号 2 に記載のアミノ酸配列からなるペプチド、

(8) 下記の群から選ばれる1または2以上のペプチドであってJNK3と結合するペプチドをコードするポリヌクレオチドを含んでなる、JNK3によるc-Junのリン酸化に基づく疾患の防止および／または治療剤；

①配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列からなるペプチド(A)、

②前記ペプチド(A)のアミノ酸配列のうち少なくとも5個の連続したアミノ酸残基からなるペプチド、

③前記ペプチド(A)と約70%以上の相同性を有するペプチド、

④前記①または②のペプチドのアミノ酸配列において1個ないし数個のアミノ酸の変異を有するペプチド、

⑤前記①から④のいずれかのペプチドを含有するペプチド、

および

⑥配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列からなるペプチド、

(9) 前記JNK3によるc-Junのリン酸化に基づく疾患が神経変性疾患である前記(6)から(8)のいずれかの防止および/または治療剤、

(10) 前記神経変性疾患がポリグルタミン病、ハンチントン病、脊髄小脳失調症、球脊髄性筋萎縮症、歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症、アルツハイマー病、ダウン症、パーキンソン病、Lewy小体型痴呆症、多系統萎縮症、家族性筋萎縮性側索硬化症、進行性核上性麻痺、皮質基底核変性症、pick病、ファミリーアルプリティッシュデメンチア(familial British dementia)、クロイツフェルトーヤコブ(Creutzfeldt-Jakob)病、ゲルストマンーストランスラー(Gerstmann-Stransler)症候群、狂牛病(ウシ海綿状脳症)(BSE)、またはニューロセリン(neuroserpin)封入体を伴う家族性痴呆症である前記(9)の防止および/または治療剤、

(11) 下記の群から選ばれるまたは2以上のペプチドであってJNK3と結合するペプチドによりJNK3によるc-Junのリン酸化を阻害することを特徴とする、JNK3によるc-Junのリン酸化に基づく疾患の防止および/または治療方法；

①配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるペプチド(A)、

②前記ペプチド(A)のアミノ酸配列のうち少なくとも5個の連続したアミノ酸残基からなるペプチド、

③前記ペプチド(A)と約70%以上の相同性を有するペプチド、

④前記①または②のペプチドのアミノ酸配列において1個ないし数個のアミノ酸の変異を有するペプチド、

⑤前記①から④のいずれかのペプチドを含有するペプチド、

および

⑥配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列からなるペプチド、

(12) 前記(5)の医薬組成物を用いることを特徴とするJNK3によるc-Junのリン酸化に基づく疾患の防止および/または治療方法、

(13) 下記の群から選ばれる1または2以上のペプチドであってJNK3と結合するペプチドをコードするポリヌクレオチドを用いることを特徴とするJNK3によるc-Junのリン酸化に基づく疾患の防止および/または治療方法;

- ①配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるペプチド(A)、
 - ②前記ペプチド(A)のアミノ酸配列のうち少なくとも5個の連続したアミノ酸残基からなるペプチド、
 - ③前記ペプチド(A)と約70%以上の相同性を有するペプチド、
 - ④前記①または②のペプチドのアミノ酸配列において1個ないし数個のアミノ酸の変異を有するペプチド、
 - ⑤前記①から④のいずれかのペプチドを含有するペプチド、
- および
- ⑥配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列からなるペプチド、

(14) 前記JNK3によるc-Junのリン酸化に基づく疾患が神経変性疾患である前記(11)から(13)のいずれかの防止および/または治療方法、

(15) 前記神経変性疾患がポリグルタミン病、ハンチントン病、脊髄小脳失調症、球脊髄性筋萎縮症、齒状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症、アルツハイマー病、ダウン症、パーキンソン病、Lewy小体型痴呆症、多系統萎縮症、家族性筋萎縮性側索硬化症、進行性核上性麻痺、皮質基底核変性症、pick病、ファミリーブリティッシュデメンチア(familial British dementia)、クロイツフェルトーヤコブ(Creutzfeldt-Jakob)病、ゲルストマンーストランスラー(Gerstmann-Stransler)症候群、狂牛病(ウシ海綿状脳症)(BSE)、またはニューロセリン(neuroserpin)封入体を伴う家族性痴呆症である前記(14)の防止および/または治療方法、

からなる。

【0010】

【発明の実施の形態】

本発明においては、JNK3と相互作用するヒト蛋白質を国際公開第WO01/67299号公報記載の方法により予測し、当該蛋白質として機能未知の蛋白

質KIAA0596（配列表の配列番号2）（GenBank、アクセッション番号：AB011168）を見い出した。KIAA0596は、JNK3と結合することが報告されているマウスJNK結合蛋白質1（JNKBP1）〔Koyano, S. et al., FEBS. (1999) 457: 385-388〕（GenBank、アクセッション番号：AB029482）と74%の相同性を示すことが判明したことから、JNKBP1のヒトホモログであることが予想された。ヒトにおいては今までにJNKBP1についての報告は無い。マウスJNKBP1はJNK3のc-Junリン酸化活性を増強するJNKシグナル経路の活性化蛋白質であり、JNKシグナル経路のスキャホールド蛋白質であるJIP-1と同じような役割を担っている可能性がある〔FEBS Lett. (1999) 457: 385-388〕。また、マウスJNKBP1のC末端領域がJNK3との結合に必要であることが知られていることから、KIAA0596のC末端領域（アミノ酸配列第639～1217番目）のペプチド（以後KIAA0596CTと呼ぶ）（配列表の配列番号1）を作製し、KIAA0596CTがJNK3と結合すること、および活性化JNK3のc-Junリン酸化を用量依存的に阻害することを見い出した。すなわち、KIAA0596CTがJNK3と結合することにより、JNK3とc-Junとの相互作用が阻害され、その結果c-Junのリン酸化が阻害されると考えられる。

【0011】

ここでペプチドとは、ペプチド結合または修飾されたペプチド結合により互いに結合している2個またはそれ以上のアミノ酸を意味し、オリゴペプチド、ポリペプチド、蛋白質を包含する。以降、アミノ酸を表記する場合、1文字にて表記することがある。

【0012】

KIAA0596およびKIAA0596CTは、既に公開されているKIAA0596 cDNAの塩基配列（GenBank、アクセッション番号：AB011168）に基づいて、公知の遺伝子工学的手法により得ることが可能である。例えば、上記cDNAの塩基配列に基づいて設計し公知の方法で合成したプライマーを用いて、例えばヒト脳由来cDNAライブラリーを用いて目的の遺伝

子を増幅し、発現ベクターに挿入して宿主細胞に導入し、K I A A 0 5 9 6またはK I A A 0 5 9 6 C Tを発現する細胞を構築し、当該細胞から公知の方法で蛋白質を抽出して精製することにより得られる。また、公知の無細胞蛋白質合成系を利用して合成することも可能である。

【0013】

一方、J N K 3によるc-J u nのリン酸化はアポトーシス、例えば神経細胞死に関与していることが報告されている〔Behrens, A. et al., Nature Genet. (1999) 21:326-329〕。また、c-J u nはトランスアクチベーターであり、遺伝子の発現制御部位に結合して当該遺伝子の転写を促進する転写活性化能を有し、そのシグナル経路の下流でなんらかのアポトーシス促進因子、例えばB i mおよびF a s Lなど、の転写を誘導すると予想されている。

【0014】

これらから、K I A A 0 5 9 6 C T（配列表の配列番号1）を用いてJ N K 3によるc-J u nのリン酸化を阻害することにより、c-J u nの転写活性化能を抑制することができ、さらにはJ N K 3によるc-J u nのリン酸化により引き起こされる生理的現象、例えばアポトーシスを抑制することが可能と考えられる。

【0015】

上記発見に基づいて、K I A A 0 5 9 6 C Tからなるc-J u nのリン酸化阻害剤、当該リン酸化阻害剤からなるc-J u nの転写活性化能の阻害剤、当該リン酸化阻害剤または当該転写活性化能の阻害剤を少なくとも1つ含有してなる医薬組成物、K I A A 0 5 9 6 C Tを用いることを特徴とするJ N K 3によるc-J u nのリン酸化の阻害方法、並びにK I A A 0 5 9 6 C TによりJ N K 3によるc-J u nのリン酸化を阻害することを特徴とするc-J u nの転写活性化能の阻害方法が提供可能である。これらは、J N Kのシグナル経路およびその機能を解明するための試薬として有用である。

【0016】

本明細書において、c-J u nの転写活性化能の阻害剤とは、c-J u nの特

定DNA配列への結合、c-Junと協同して転写を行う他因子との結合など、c-Junを含む転写活性装置になんらかの形で作用することにより、最終的にc-Junが関与する転写活性を阻害するものを意味する。

【0017】

JNKシグナル経路が、ポリグルタミン病による細胞死のモデル系においてポリグルタミンを含む凝集体の中で活性化していること、またポリグルタミンによる細胞死をMKK4（JNKシグナルにおいてJNKの上流に位置し、JNKをリン酸化して活性化せしめるMAPキナーゼキナーゼ4）やc-Junのドミナントネガティブ変異体が抑制することが報告されている〔Yasuda, S. et al., Genes to Cells (1999) 4: 734-756〕。さらに、アルツハイマー病の原因遺伝子アミロイド・プレカーサー・プロテイン（APP）の切断産物アミロイドβによる細胞死にJNKが関与することも示されている〔浦 誠司ら、実験医学（2001）19: 1839-1844〕。

【0018】

これらから、KIAA059そのアミノ酸配列においてJNK3によるc-Junのリン酸化を阻害することにより、JNK3によるc-Junのリン酸化に基づく疾患、例えば神経変性疾患など、の解明並びに防止および／または治療が可能になると考えられる。神経変性疾患としては、次に挙げる例に限定されるものではないが、ポリグルタミン病（例えばハンチントン病、脊髄小脳失調症、球脊髄性筋萎縮症、および齒状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症など）、並びにアルツハイマー病、ダウン症、パーキンソン病、Lewy小体型痴呆症、多系統萎縮症、家族性筋萎縮性側索硬化症、進行性核上性麻痺、皮質基底核変性症、pick病、ファミリーアルプリティッシュデメンチア（familial British dementia）、クロイツフェルトーヤコブ（Creutzfeldt-Jakob）病、ゲルストマンーストランスラー（Gerstmann-Strausler）症候群、狂牛病（ウシ海綿状脳症）（BSE）、およびニューロセリン（neuroserpin）封入体を伴う家族性痴呆症などが挙げられる。上記リン酸化阻害剤、上記転写活性化能の阻害剤、または上記医薬組成物は、上記疾患の防止および／または治療剤、並びにこれらを用いることを特徴とする上

記疾患の防止および／または治療方法に使用できる。

【0019】

K I A A 0 5 9 6 C Tと同様に、K I A A 0 5 9 6 C Tの部分配列を有するペプチドであってJ N K 3とK I A A 0 5 9 6 C Tとの結合部位を含むペプチドのうちJ N K 3と結合し得るペプチドは、J N K 3とc-J u nとの相互作用を阻害できるため、J N K 3によるc-J u nのリン酸化阻害に利用できる。当該部分配列を有するペプチドは、その最小単位として5個以上のアミノ酸、好ましくは8個以上のアミノ酸、より好ましくは12個以上、さらに好ましくは15個以上の連続するアミノ酸からなるものである。また、K I A A 0 5 9 6 C Tまたはその部分配列を有するペプチドのアミノ酸配列において1個ないし数個のアミノ酸に変異、例えば置換、欠失、付加、または挿入など、を有するアミノ酸配列からなるペプチド、あるいはK I A A 0 5 9 6 C Tと約70%以上の相同性を有するペプチドであって、J N K 3と結合し得るペプチドも、J N K 3によるc-J u nのリン酸化阻害に利用できる。上記ペプチドは、その性質として、J N K 3とK I A A 0 5 9 6 C Tとの結合を阻害し得る。かかるペプチドは、K I A A 0 5 9 6 C Tのアミノ酸配列に基づいて設計して自体公知の方法で合成し、J N K 3とK I A A 0 5 9 6 C Tとの結合を指標にして自体公知の方法で（実施例参照）阻害作用を確認することにより得ることができる。また、上記変異を有するペプチドは天然に存在するものであってよく、また変異を導入したものであってもよい。欠失、置換、付加あるいは挿入などの変異を導入する場合、その手段は自体公知であり、例えば部位特異的変異導入法、遺伝子相同組換え法、プライマー伸長法またはポリメラーゼ連鎖増幅法（P C R）を単独または適宜組み合わせて、例えばサムブルック等編「モレキュラークローニング、ア ラボラトリーマニュアル 第2版」コールドスプリングハーバーラボラトリー、1989、村松正實編「ラボマニュアル遺伝子工学」丸善株式会社、1988、エールリッヒ、H E. 編「P C Rテクノロジー、DNA増幅の原理と応用」ストックトンプレス、1989等の成書に記載の方法に準じて、あるいはそれらの方法を改変して利用することにより得ることができる。例えばU l m e rの技術「S c i e n c e （1983）219：666」を利用することができる。このような変異の導入に

において、当該ペプチドの基本的な性質（物性、活性、または免疫学的活性等）を変化させないという観点からは、例えば、同族アミノ酸（極性アミノ酸、非極性アミノ酸、疎水性アミノ酸、親水性アミノ酸、陽性荷電アミノ酸、陰性荷電アミノ酸、芳香族アミノ酸等）の間での相互置換は容易に想定される。

【0020】

さらに、K I A A 0 5 9 6 C T または上記ペプチドを含有するペプチドは、K I A A 0 5 9 6 C T と同様に J N K 3 と結合して J N K 3 と c - J u n との相互作用を阻害すると考えられる。かかるペプチドとしては、例えば K I A A 0 5 9 6 C T を含む K I A A 0 5 9 6 （配列表の配列番号 2）を挙げることができる。

【0021】

本発明においては、下記の群から選ばれる 1 または 2 以上のペプチドであって J N K 3 と結合するペプチド；K I A A 0 5 9 6 C T の部分配列を有するペプチド；K I A A 0 5 9 6 C T のアミノ酸配列において 1 個ないし数個のアミノ酸の変異を有するペプチド；K I A A 0 5 9 6 C T と約 7 0 % 以上の相同性を有するペプチド；K I A A 0 5 9 6 C T 若しくは上記ペプチドを含むペプチド、例えば K I A A 0 5 9 6 ；からなる J N K 3 による c - J u n のリン酸化阻害剤、当該リン酸化阻害剤からなる c - J u n の転写活性化能の阻害剤、当該リン酸化阻害剤または当該転写活性化能の阻害剤を含有してなる医薬組成物が提供可能である。また、上記ペプチドを用いることを特徴とする J N K 3 による c - J u n のリン酸化の阻害方法、並びに上記ペプチドにより J N K 3 による c - J u n のリン酸化を阻害することを特徴とする c - J u n の転写活性化能の阻害方法が提供可能である。さらに、上記の群から選ばれる 1 または 2 以上のペプチドを用いて J N K 3 による c - J u n のリン酸化を阻害することにより、J N K 3 による c - J u n のリン酸化に基づく疾患、例えば神経変性疾患などの解明並びに防止および／または治療が可能になると考えられる。上記リン酸化阻害剤、上記転写活性化能の阻害剤、または上記医薬組成物は、上記疾患の防止および／または治療剤、並びにこれらを用いることを特徴とする上記疾患の防止および／または治療方法に使用できる。

【0022】

上記リン酸化阻害剤または転写活性化能の阻害剤の阻害剤として使用される K I A A 0 5 9 6 C T または上記ペプチドは、その検出または精製を容易にするために、あるいは別の機能を付加するために、その N 末端側や C 末端側に別の物質を結合したものであってもよい。結合される物質としては、例えばグルタチオン S-トランスフェラーゼ (G S T)、アルカリホスファターゼ、 β -ガラクトシダーゼ、I g G 等の免疫グロブリン F c 断片、または F L A G - t a g などのペプチドなど、が挙げられる。これらを直接またはリンカーペプチド等を介して間接的に、遺伝子工学的手法等を用いて付加することは当業者には容易である。

【 0 0 2 3 】

また、蛋白質発現用のベクターやトランスポーターを用いて、K I A A 0 5 9 6 C T または上記ペプチドをコードするポリヌクレオチドをインピボで発現させて J N K 3 による c - J u n のリン酸化を阻害し、上記疾患を防止および／または治療することも可能である。K I A A 0 5 9 6 C T または上記ペプチドのインピボでの発現は、公知の方法を利用して実施できる。例えば K I A A 0 5 9 6 C T または上記ペプチドをコードするポリヌクレオチドを処理剤として、核酸ベクター、例えば複製欠損レトロウイルスベクターなど、に挿入して対象の細胞中に送達することにより可能である。したがって、K I A A 0 5 9 6 C T または上記ペプチドをコードするポリヌクレオチドを 1 または 2 以上含有してなる、J N K 3 による c - J u n のリン酸化に基づく疾患の防止および／または治療剤も本発明の範囲に含まれる。

【 0 0 2 4 】

本発明において、リン酸化阻害剤、上記転写活性化能の阻害剤、上記医薬組成物、または上記防止および／若しくは治療剤の処方および投与形態は、適当な医薬担体と組み合わせて処方することが好ましい。かかる処方は、治療上有効量の上記リン酸化阻害剤、上記転写活性化能の阻害剤、上記医薬組成物、または上記防止および／若しくは治療剤、さらに医薬上許容される担体または賦形剤を含む。かかる担体としては、生理食塩水、緩衝化生理食塩水、デキストロース、水、グリセロール、エタノール、およびそれらの混合物が挙げられるが、これらに限らない。処方投与経路に適したものを選択すればよく、該処方は当業者によく

知られている。

【0025】

上記リン酸化阻害剤、上記転写活性化能の阻害剤、上記医薬組成物、または上記防止および／若しくは治療剤の処方および投与形態は、単独で使用してもよく、あるいは治療に必要な他の化合物と一緒に使用してもよい。上記リン酸化阻害剤、上記転写活性化能の阻害剤、上記医薬組成物、または上記防止および／若しくは治療剤の全身投与の好ましい一態様は、注射、例えば静脈注射が挙げられる。皮下、筋肉内または腹腔内のような他の注射経路を用いることもできる。投与の別の態様は、腸溶処方またはカプセル処方がうまく処方されるならば、経口投与も可能である。さらに、胆汁酸塩またはフシジン酸または他の界面活性剤のような浸透剤を用いる経粘膜または経皮投与を用いることもできる。投与は局所的なものであってもよく、膏薬、パスタ、ゲルなどの形態での投与であってもよい。

【0026】

必要な用量範囲は、上記リン酸化阻害剤、上記転写活性化能の阻害剤、上記医薬組成物、または上記防止および／若しくは治療剤の有効性、投与経路、処方の性質、対象の症状の性質、および担当医師の判断による。具体的には、適当な用量は、例えば対象の体重1kgあたり0.1ないし100μgの範囲である。しかしながら、当該分野においてよく知られた最適化のための一般的な常套的実験を用いてこれらの用量の変更を行うことができる。

【0027】

製剤化にあたっては蛋白質など各対象の物性に応じた公知の製剤化手段を導入すればよい。具体的には例えば、散剤、丸剤、錠剤、カプセル製剤、水溶液製剤、エタノール溶液製剤、リポソーム製剤、脂肪乳剤、シクロデキストリンなどの包接体などの製剤化方法が利用できる。

【0028】

散剤、丸剤、カプセル剤および錠剤は、ラクトース、グルコース、シュクロース、マンニトールなどの賦形剤、澱粉、アルギン酸ソーダなどの崩壊剤、マグネシウムステアレート、タルクなどの滑沢剤、ポリビニルアルコール、ヒドロキ

シプロピルセルロース、ゼラチンなどの結合剤、脂肪酸エステルなどの界面活性剤、グリセリンなどの可塑剤などを用いて製造できる。錠剤やカプセルを製造するには、固体の製薬担体を用いられる。

【 0 0 2 9 】

懸濁剤は、水、シュクロース、ソルビトール、フラクトースなどの糖類、PEGなどのグリコール類、油類を使用して製造できる。

【 0 0 3 0 】

注射用の溶液は、塩溶液、グルコース溶液または、塩水とグルコース溶液の混合物からなる担体を用いて調製可能である。

【 0 0 3 1 】

リポソーム化は例えば、リン脂質を有機溶媒（クロロホルムなど）に溶解した溶液に、当該物質を溶媒（エタノールなど）に溶解した溶液を加えた後、溶媒を留去し、これにリン酸緩衝液を加え、振盪、超音波処理および遠心分離した後、上清を濾過処理して回収することにより行い得る。

【 0 0 3 2 】

脂肪乳剤化は例えば、当該物質、油成分（大豆油、ゴマ油、オリーブ油などの植物油、MCTなど）、乳化剤（リン脂質など）などを混合、加熱して溶液とした後に、必要量の水を加え、乳化機（ホモジナイザー、例えば、高圧噴射型、超音波型など）を用いて、乳化・均質化処理して行い得る。また、これを凍結乾燥化することも可能である。なお、脂肪乳剤化するとき、乳化助剤を添加してもよく、乳化助剤としては、例えば、グリセリン、糖類（例えば、ブドウ糖、ソルビトール、果糖など）が例示される。

【 0 0 3 3 】

シクロデキストリン包接化は例えば、当該物質を溶媒（エタノールなど）に溶解した溶液に、シクロデキストリンを水などに加温溶解した溶液を加えた後、冷却して析出した沈殿を濾過し、滅菌乾燥することにより行い得る。この際、使用されるシクロデキストリンは、当該物質の大きさに応じて、空隙直径の異なるシクロデキストリン（ α 、 β 、 γ 型）を適宜選択すればよい。

【 0 0 3 4 】

【実施例】

以下、本発明を実施例に基づき具体的に説明するが、本発明は下記の実施例に限定されない。

【実施例1】

(JNK3と相互作用する蛋白質のインシリコでの探索)

JNK3と相互作用する蛋白質を、国際公開第WO01/67299号公報に記載の予測方法にしたがってインシリコで予測した。すなわち、JNK3のアミノ酸配列をある長さのオリゴペプチドに分解し、各オリゴペプチドのアミノ酸配列あるいはそのアミノ酸配列と相同なアミノ酸配列を持った蛋白質をデータベース中で検索し、得られた蛋白質とJNK3との間でローカルアライメントを行い、ローカルアライメントのスコアの高いものをJNK3と相互作用すると予測した。ここではローカルアライメントのスコアを、国際公開第WO01/67299号公報に記載の方法と同様に、25.0以上とした。また、JNK3は脳神経系に特異的に発現する蛋白質であり、低酸素状態などのショック的状況で発現し、脳機能に障害を与えることが分かっているため、JNK3と相互作用する蛋白質の候補は、脳で発現し重要な機能を持っている既知の蛋白質に絞った。

【0035】

この結果、JNK3由来の6アミノ酸残基からなるオリゴペプチドSLFPADと相同性あるオリゴペプチドSLPPADが、機能未知の蛋白質KIAA0596 (GenBank、アクセッション番号: AB011168) のアミノ酸配列中に存在することが分かった。図1に、JNK3とKIAA0596とのローカルアライメントの結果を示した。

【0036】

(JNK3によるc-Junのリン酸化に対するKIAA0596の作用解析)

KIAA0596は、JNK3と結合することが報告されているマウスJNK結合蛋白質1 (JNKBP1) [Koyano, S. et al., FEBS, (1999) 457:385-388] (GenBank、アクセッション番号: AB029482) と74%の相同性を示すことが判明したことから、JNKBP1のヒトホモログであることが予想された。ヒトにおいては今までにJNK

BP1についての報告は無い。マウスJNKBP1はJNK3のc-Junリン酸化活性を増強するJNKシグナル経路の活性化蛋白質であり、JNKシグナル経路のスキヤホールド蛋白質であるJIP-1と同じような役割を担っている可能性がある〔FEBS Lett. (1999) 457:385-388〕。また、マウスJNKBP1は、そのC末端領域がJNK3との結合に必要であることが知られている。そこで、KIAA0596のC末端領域（アミノ酸配列第639～1217番目、以後KIAA0596CTと呼ぶ）とJNK3との結合をファー・ウエスタン（Far-western）法により解析した。さらに、活性化JNK3のc-Junリン酸化へのKIAA0596CTの作用を試験した。

【0037】

＜材料＞

結合試験に用いたヒトJNK3は、N末端マルトース結合蛋白質（MBP）融合蛋白質（MBP-JNK3）として調製した。まず、ヒト海馬cDNAライブラリーを鋳型として逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）により得たヒトJNK3（JNK3 α 1）cDNAを、pMAL-c2（New England Biolabs社）に挿入し、添付の説明書に従い、MBP-JNK3発現ベクターを構築した。当該ベクターを大腸菌（E. coli）DH5 α 株に導入し、MBP-JNK3の発現を誘導した。菌体を回収して抽出液を調整し、アミロース・レジン（amylose resin）を用いてMBP-JNK3を精製した。精製蛋白質は、透析後に使用した。

【0038】

リン酸化試験に用いた活性化型ヒトJNK3は、N末端ヒスチジンタグ（His-tag）付加蛋白質（以下、His-JNK3）として調製した。まず、ヒト海馬cDNAライブラリーを鋳型として逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）により得たヒトJNK3（JNK3 α 1）cDNAを、pFASTBAC HT（Invitrogen社）に挿入し、添付の説明書に従い、His-JNK3発現用組換えバキュロウイルスを作製した。次に、作製した組換えウイルスをSf9細胞に感染させてHis-JNK3を発現させ、プロボンドレジン

(Probond Resin) (Invitrogen社)で精製して使用した。

【0039】

c-Jun (1-79) (c-JunのN末端79アミノ酸領域であり、JNKによるリン酸化部位を含む)は、N末端GST融合蛋白質〔以下、GST-c-Jun (1-79)〕として大腸菌にて発現後、グルタチオン セファローズ 4B (Glutathione sepharose 4B) (Amersham Pharmacia biotech社)で精製して使用した。

【0040】

ヒトKIAA0596CTは、N末端グルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST) 融合蛋白質 (以下、GST-KIAA0596CT) として大腸菌にて発現後、Glutathione sepharose 4B (Amersham Pharmacia biotech社)で精製して使用した。すなわち、まずKIAA0596クローン (かずさDNA研究所より入手) を鋳型としてKIAA0596の塩基配列第191番目から第3655番目までの領域をPCRにより増幅後、ゲートウェイクローニングテクノロジー (Invitrogen社) を用いてpDEST15ベクター (Invitrogen社) に組み込み、大腸菌用GST-KIAA0596CT発現ベクターを構築した。当該ベクターを大腸菌BL21-SI株 (Invitrogen社) に導入後、100 μ g/mlのアンプシリンを含むLBON培地中 (NaClを含まないLB培地) にて37℃で培養後、NaClを終濃度0.3Mとなるように添加し、さらに25℃で培養してGST-KIAA0596CTの発現を誘導した。菌体を回収して抽出液を調整し、Glutathione sepharose 4Bを用いてGST-KIAA0596CTを精製した。精製蛋白質は透析後に使用した。

【0041】

<結合試験>

ニトロセルロースメンブレン (Schleicher & Schuell社、BA85) 上に1 μ gのGSTまたはGST-KIAA0596CTをスポットした後、メンブレンを5% スキムミルクを含むTBST (10mM Tri

s-HCl, pH7.5/0.15M NaCl/0.05% Tween20) 中で、室温にてインキュベーションした。メンブレンをTBSTでリンスした後、 $1.0 \mu\text{g}/\text{ml}$ のMBP-JNK3またはMBPを含むTBST中にて、 4°C で一晩インキュベーションした。メンブレンをTBSTで洗浄後、1次抗体として抗MBP抗血清(New England Biolabs社)、2次抗体としてホースラディッシュ・パーオキシダーゼ結合抗ウサギIgG抗体(Amersham pharmacia biotech社)を用いたイムノブロッティングにより、結合したMBP-JNK3を検出した。なお、検出にはECLウエスタンブロッティング・ディテクション・キット(Amersham pharmacia biotech社)を使用した(図2)。

【0042】

<インビトロ リン酸化実験(In vitro kinase assay)>

$1 \mu\text{g}$ のGST-c-Jun(1-79)と活性化型JNK3(70ng)を、GSTまたはGST-A0596CT(共に $1 \mu\text{g}$ または $2 \mu\text{g}$)の存在下または非存在下で、 $100 \mu\text{M}$ のATP(アデノシン三リン酸)を含むカイネーションバッファー(kination buffer)(25mM Tris-HCl, pH7.5/ 5mM β -glycerophosphate/ 2mM DTT/ 0.1mM Na_3VO_4 / 10mM MgCl_2)中にて、 30°C で30分間インキュベーションすることにより、リン酸化反応を行った。反応後、等量の $2\times\text{SDS}$ サンプルバッファー[4% SDS/ 125mM Tris-HCl, pH6.8/ 20% glycerol/ 0.01% ブロムフェノールブルー(BPB)/ 10% β -メルカプトエタノール(mercaptoethanol)]を加え、 100°C で5分間処理した後、上清を 10% SDS-PAGEにより分離し、1次抗体として抗リン酸化c-Jun(S63)抗体(anti-Phospho-c-Jun(S63) antibody)(New England Biolabs社)を、2次抗体としてホースラディッシュ・パーオキシダーゼ結合抗ウサギIgG抗体(HRP-conjugated anti-rabbit IgG antibody)(Amers

ham pharmacia biotech社)を用いたイムノブロッティングによりリン酸化されたGST-c-Jun (1-79)を検出した(図3)。検出にはECLウエスタンブロッティング・ディテクション・キット(Amersham pharmacia biotech社)を使用した。さらに、検出されたリン酸化GST-c-Jun (1-79)のバンド強度を画像解析ソフト、Intelligent Quantifier (Bio Image社)を用いて定量し、GSTまたはGST-KIAA0596CT存在下でのバンド強度を、非存在下での強度を100%としたときの相対強度で示した(表1)。

【0043】

<結果>

図2に示したように、GST-KIAA0596CTとMBP-JNK3との結合が認められた。しかし、GST-KIAA0596CTとMBPとの結合、およびGSTとMBP-JNK3との結合は認められなかったことから、検出されたGST-KIAA0596CTとMBP-JNK3との結合は特異的であることが確認された。

【0044】

さらに、図3および表1に示したように、1 μ gまたは2 μ gのKIAA0596CT存在下では、JNK3によるGST-c-Jun (1-79)のリン酸化がそれぞれ約30%または約67%阻害された。一方、陰性コントロールであるGST存在下ではJNK3によるGST-c-Jun (1-79)のリン酸化に変化はなかった。これらから、JNK3によるGST-c-Jun (1-79)のリン酸化がKIAA0596CTにより用量依存的に阻害されることが明らかになった。

【0045】

【表 1】

添加した蛋白質	添加量 (μ g)	相対強度 (%)
なし		100
GST	1.0	92.7
	2.0	93.6
GST-KIAA0596CT	1.0	70.6
	2.0	33.5

【0046】

【発明の効果】

本発明においては、ヒト蛋白質KIAA0596のアミノ酸配列第639～1217番目の579アミノ酸残基からなるペプチド(KIAA0596CT)がJNK3と結合し、さらにJNK3によるc-Junのリン酸化を阻害することを初めて見出した。c-Junはトランスアクチベーターであり転写活性化能を有することが知られている。また、神経細胞死が認められる疾患、例えばポリグルタミン病やアルツハイマー病など、においてJNK3の関与が認められている。したがって、上記ペプチド、または当該ペプチドを含むペプチド、例えばKIAA0596、を用いてJNK3によるc-Junのリン酸化を阻害することにより、c-Junの転写活性化能を抑制することができ、さらにはJNK3によるc-Junのリン酸化により引き起こされる生理的現象、例えばアポトーシスを抑制することが可能と考えられる。

これらのことから本発明は、KIAA0596CT、並びにJNK3と結合する下記ペプチド；KIAA0596CTの部分配列を有するペプチド；KIAA0596CTのアミノ酸配列において1個ないし数個のアミノ酸の変異を有するペプチド；KIAA0596CTと約70%以上の相同性を有するペプチド；K

IAA0596CT若しくは上記ペプチドを含むペプチド；によりJNK3によるc-Junのリン酸化を阻害することによる、c-Junの機能抑制、例えば転写活性化能抑制；これを利用したアポトーシス抑制、例えば神経細胞のアポトーシス抑制；あるいは神経変性疾患などの防止および／または治療；に用いる薬剤、医薬組成物およびその方法を提供可能であり、またJNKシグナル経路およびその機能の研究のために非常に有用である。

【 0 0 4 7 】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> CELESTAR LEXICO-SCIENCES, INC.

DAIICHI PHARMACEUTICAL CO., LTD.

<120> A c-Jun phosphorylation inhibitor (KIAA0596)

<130> NP02-1028

<140>

<141>

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 579

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Leu Ser Gln Glu Glu Gly Val Phe Ala Gln Asp Leu Glu Pro Ala Pro

1

5

10

15

Ile Glu Asp Gly Ile Val Tyr Pro Glu Pro Ser Asp Asn Pro Thr Met

20

25

30

Asp Thr Ser Glu Phe Gln Val Gln Ala Pro Ala Arg Gly Thr Leu Gly

35

40

45

Arg Val Tyr Pro Gly Ser Arg Ser Ser Glu Lys His Ser Pro Asp Ser

50

55

60

Ala Cys Ser Val Asp Tyr Ser Ser Ser Cys Leu Ser Ser Pro Glu His

65

70

75

80

Pro Thr Glu Asp Ser Glu Ser Thr Glu Pro Leu Ser Val Asp Gly Ile

85

90

95

Asp Leu Glu Glu Pro Ala Glu Gly Asp Glu Glu Glu Glu Glu

100

105

110

Glu Glu Gly Gly Met Gly Pro Tyr Gly Leu Gln Glu Gly Ser Pro Gln

115

120

125

Thr Pro Asp Gln Glu Gln Phe Leu Lys Gln His Phe Glu Thr Leu Ala

130

135

140

Ser Gly Ala Ala Pro Gly Ala Pro Val Gln Val Pro Glu Arg Ser Glu

145

150

155

160

Ser Arg Ser Ile Ser Ser Arg Phe Leu Leu Gln Val Gln Thr Arg Pro

165

170

175

Leu Arg Glu Pro Ser Pro Ser Ser Ser Ser Leu Ala Leu Met Ser Arg
180 185 190

Pro Ala Gln Val Pro Gln Ala Ser Gly Glu Gln Pro Arg Gly Asn Gly
195 200 205

Ala Asn Pro Pro Gly Ala Pro Pro Glu Val Glu Pro Ser Ser Gly Asn
210 215 220

Pro Ser Pro Gln Gln Ala Ala Ser Val Leu Leu Pro Arg Cys Arg Leu
225 230 235 240

Asn Pro Asp Ser Ser Trp Ala Pro Lys Arg Val Ala Thr Ala Ser Pro
245 250 255

Phe Ser Gly Leu Gln Lys Ala Gln Ser Val His Ser Leu Val Pro Gln
260 265 270

Glu Arg His Glu Ala Ser Leu Gln Ala Pro Ser Pro Gly Ala Leu Leu
275 280 285

Ser Arg Glu Ile Glu Ala Gln Asp Gly Leu Gly Ser Leu Pro Pro Ala
290 295 300

Asp Gly Pro Pro Ser Arg Pro His Ser Tyr Gln Asn Pro Thr Thr Ser
305 310 315 320

Ser Met Ala Lys Ile Ser Arg Ser Ile Ser Val Gly Glu Asn Leu Gly
325 330 335

Leu Val Ala Glu Pro Gln Ala His Ala Pro Ile Arg Val Ser Pro Leu

340

345

350

Ser Lys Leu Ala Leu Pro Ser Arg Ala His Leu Val Leu Asp Ile Pro

355

360

365

Lys Pro Leu Pro Asp Arg Pro Thr Leu Ala Ala Phe Ser Pro Val Thr

370

375

380

Lys Gly Arg Ala Pro Gly Glu Ala Glu Lys Pro Gly Phe Pro Val Gly

385

390

395

400

Leu Gly Lys Ala His Ser Thr Thr Glu Arg Trp Ala Cys Leu Gly Glu

405

410

415

Gly Thr Thr Pro Lys Pro Arg Thr Glu Cys Gln Ala His Pro Gly Pro

420

425

430

Ser Ser Pro Cys Ala Gln Gln Leu Pro Val Ser Ser Leu Phe Gln Gly

435

440

445

Pro Glu Asn Leu Gln Pro Pro Pro Pro Glu Lys Thr Pro Asn Pro Met

450

455

460

Glu Cys Thr Lys Pro Gly Ala Ala Leu Ser Gln Asp Ser Ala Val Ser

465

470

475

480

Leu Glu Gln Cys Glu Gln Leu Val Ala Glu Leu Arg Gly Ser Val Arg

485

490

495

Gln Ala Val Arg Leu Tyr His Ser Val Ala Gly Cys Lys Met Pro Ser

500

505

510

Ala Glu Gln Ser Arg Ile Ala Gln Leu Leu Arg Asp Thr Phe Ser Ser

515

520

525

Val Arg Gln Glu Leu Glu Ala Val Ala Gly Ala Val Leu Ser Ser Pro

530

535

540

Gly Ser Ser Pro Gly Ala Val Gly Ala Glu Gln Thr Gln Ala Leu Leu

545

550

555

560

Glu Gln Tyr Ser Glu Leu Leu Leu Arg Ala Val Glu Arg Arg Met Glu

565

570

575

Arg Lys Leu

<210> 2

<211> 1217

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Ser Asn Lys Val Ser Ser Arg Val Thr Ala Val Ser Phe Ser Glu Asp

1

5

10

15

Cys Ser Tyr Phe Val Thr Ala Gly Asn Arg His Ile Lys Phe Trp Tyr
20 25 30

Leu Asp Asp Ser Lys Thr Ser Lys Val Asn Ala Thr Val Pro Leu Leu
35 40 45

Gly Arg Ser Gly Leu Leu Gly Glu Leu Arg Asn Asn Leu Phe Thr Asp
50 55 60

Val Ala Cys Gly Arg Gly Lys Lys Ala Asp Ser Thr Phe Cys Ile Thr
65 70 75 80

Ser Ser Gly Leu Leu Cys Glu Phe Ser Asp Arg Arg Leu Leu Asp Lys
85 90 95

Trp Val Glu Leu Arg Val Tyr Pro Glu Val Lys Asp Ser Asn Gln Ala
100 105 110

Cys Leu Pro Pro Ser Ser Phe Ile Thr Cys Ser Ser Asp Asn Thr Ile
115 120 125

Arg Leu Trp Asn Thr Glu Ser Ser Gly Val His Gly Ser Thr Leu His
130 135 140

Arg Asn Ile Leu Ser Ser Asp Leu Ile Lys Ile Ile Tyr Val Asp Gly
145 150 155 160

Asn Thr Gln Ala Leu Leu Asp Thr Glu Leu Pro Gly Gly Asp Lys Ala

165

170

175

Asp Ala Ser Leu Leu Asp Pro Arg Val Gly Ile Arg Ser Val Cys Val

180

185

190

Ser Pro Asn Gly Gln His Leu Ala Ser Gly Asp Arg Met Gly Thr Leu

195

200

205

Arg Val His Glu Leu Gln Ser Leu Ser Glu Met Leu Lys Val Glu Ala

210

215

220

His Asp Ser Glu Ile Leu Cys Leu Glu Tyr Ser Lys Pro Asp Thr Gly

225

230

235

240

Leu Lys Leu Leu Ala Ser Ala Ser Arg Asp Arg Leu Ile His Val Leu

245

250

255

Asp Ala Gly Arg Glu Tyr Ser Leu Gln Gln Thr Leu Asp Glu His Ser

260

265

270

Ser Ser Ile Thr Ala Val Lys Phe Ala Ala Ser Asp Gly Gln Val Arg

275

280

285

Met Ile Ser Cys Gly Ala Asp Lys Ser Ile Tyr Phe Arg Thr Ala Gln

290

295

300

Lys Ser Gly Asp Gly Val Gln Phe Thr Arg Thr His His Val Val Arg

305

310

315

320

Lys Thr Thr Leu Tyr Asp Met Asp Val Glu Pro Ser Trp Lys Tyr Thr

325

330

335

Ala Ile Gly Cys Gln Asp Arg Asn Ile Arg Ile Phe Asn Ile Ser Ser

340

345

350

Gly Lys Gln Lys Lys Leu Phe Lys Gly Ser Gln Gly Glu Asp Gly Thr

355

360

365

Leu Ile Lys Val Gln Thr Asp Pro Ser Gly Ile Tyr Ile Ala Thr Ser

370

375

380

Cys Ser Asp Lys Asn Leu Ser Ile Phe Asp Phe Ser Ser Gly Glu Cys

385

390

395

400

Val Ala Thr Met Phe Gly His Ser Glu Ile Val Thr Gly Met Lys Phe

405

410

415

Ser Asn Asp Cys Lys His Leu Ile Ser Val Ser Gly Asp Ser Cys Ile

420

425

430

Phe Val Trp Arg Leu Ser Ser Glu Met Thr Ile Ser Met Arg Gln Arg

435

440

445

Leu Ala Glu Leu Arg Gln Arg Gln Arg Gly Gly Lys Gln Gln Gly Pro

450

455

460

Ser Ser Pro Gln Arg Ala Ser Gly Pro Asn Arg His Gln Ala Pro Ser

465

470

475

480

Met Leu Ser Pro Gly Pro Ala Leu Ser Ser Asp Ser Asp Lys Glu Gly

485

490

495

Glu Asp Glu Gly Thr Glu Glu Glu Leu Pro Ala Leu Pro Val Leu Ala

500

505

510

Lys Ser Thr Lys Lys Ala Leu Ala Ser Val Pro Ser Pro Ala Leu Pro

515

520

525

Arg Ser Leu Ser His Trp Glu Met Ser Arg Ala Gln Glu Ser Val Gly

530

535

540

Phe Leu Asp Pro Ala Pro Ala Ala Asn Pro Gly Pro Arg Arg Arg Gly

545

550

555

560

Arg Trp Val Gln Pro Gly Val Glu Leu Ser Val Arg Ser Met Leu Asp

565

570

575

Leu Arg Gln Leu Glu Thr Leu Ala Pro Ser Leu Gln Asp Pro Ser Gln

580

585

590

Asp Ser Leu Ala Ile Ile Pro Ser Gly Pro Arg Lys His Gly Gln Glu

595

600

605

Ala Leu Glu Thr Ser Leu Thr Ser Gln Asn Glu Lys Pro Pro Arg Pro

610

615

620

Gln Ala Ser Gln Pro Cys Ser Tyr Pro His Ile Ile Arg Leu Leu Ser

625	630	635	640
Gln Glu Glu Gly Val Phe Ala Gln Asp Leu Glu Pro Ala Pro Ile Glu			
645	650	655	
Asp Gly Ile Val Tyr Pro Glu Pro Ser Asp Asn Pro Thr Met Asp Thr			
660	665	670	
Ser Glu Phe Gln Val Gln Ala Pro Ala Arg Gly Thr Leu Gly Arg Val			
675	680	685	
Tyr Pro Gly Ser Arg Ser Ser Glu Lys His Ser Pro Asp Ser Ala Cys			
690	695	700	
Ser Val Asp Thr Ser Ser Ser Cys Leu Ser Ser Pro Glu His Pro Thr			
705	710	715	720
Glu Asp Ser Glu Ser Thr Glu Pro Leu Ser Val Asp Gly Ile Ser Ser			
725	730	735	
Asp Leu Glu Glu Pro Ala Glu Gly Asp Glu Glu Glu Glu Glu Glu			
740	745	750	
Gly Gly Met Gly Pro Tyr Gly Leu Gln Glu Gly Ser Pro Gln Thr Pro			
755	760	765	
Asp Gln Glu Gln Phe Leu Lys Gln His Phe Glu Thr Leu Ala Ser Gly			
770	775	780	

Ala Ala Pro Gly Ala Pro Val Gln Val Pro Glu Arg Ser Glu Ser Arg
785 790 795 800

Ser Ile Ser Ser Arg Phe Leu Leu Gln Val Gln Thr Arg Pro Leu Arg
805 810 815

Glu Pro Ser Pro Ser Ser Ser Ser Leu Ala Leu Met Ser Arg Pro Ala
820 825 830

Gln Val Pro Gln Ala Ser Gly Glu Gln Pro Arg Gly Asn Gly Ala Asn
835 840 845

Pro Pro Gly Ala Pro Pro Glu Val Glu Pro Ser Ser Gly Asn Pro Ser
850 855 860

Pro Gln Gln Ala Ala Ser Val Leu Leu Pro Arg Cys Arg Leu Asn Pro
865 870 875 880

Asp Ser Ser Trp Ala Pro Lys Arg Val Ala Thr Ala Ser Pro Phe Ser
885 890 895

Gly Leu Gln Lys Ala Gln Ser Val His Ser Leu Val Pro Gln Glu Arg
900 905 910

His Glu Ala Ser Leu Gln Ala Pro Ser Pro Gly Ala Leu Leu Ser Arg
915 920 925

Glu Ile Glu Ala Gln Asp Gly Leu Gly Ser Leu Pro Pro Ala Asp Gly
930 935 940

Pro Pro Ser Arg Pro His Ser Tyr Gln Asn Pro Thr Thr Ser Ser Met
945 950 955 960

Ala Lys Ile Ser Arg Ser Ile Ser Val Gly Glu Asn Leu Gly Leu Val
965 970 975

Ala Glu Pro Gln Ala His Ala Pro Ile Arg Val Ser Pro Leu Ser Lys
980 985 990

Leu Ala Leu Pro Ser Arg Ala His Leu Val Leu Asp Ile Pro Lys Pro
995 1000 1005

Leu Pro Asp Arg Pro Thr Leu Ala Ala Phe Ser Pro Val Thr Lys Gly
1010 1015 1020

Arg Ala Pro Gly Glu Ala Glu Lys Pro Gly Phe Pro Val Gly Leu Gly
1025 1030 1035 1040

Lys Ala His Ser Thr Thr Glu Arg Trp Ala Cys Leu Gly Glu Gly Thr
1045 1050 1055

Thr Pro Lys Pro Arg Thr Glu Cys Gln Ala His Pro Gly Pro Ser Ser
1060 1065 1070

Pro Cys Ala Gln Gln Leu Pro Val Ser Ser Leu Phe Gln Gly Pro Glu
1075 1080 1085

Asn Leu Gln Pro Pro Pro Pro Glu Lys Thr Pro Asn Pro Met Glu Cys

1090

1095

1100

Thr Lys Pro Gly Ala Ala Leu Ser Gln Asp Ser Ala Val Ser Leu Glu

1105

1110

1115

1120

Gln Cys Glu Gln Leu Val Ala Glu Leu Arg Gly Ser Val Arg Gln Ala

1125

1130

1135

Val Arg Leu Tyr His Ser Val Ala Gly Cys Lys Met Pro Ser Ala Glu

1140

1145

1150

Gln Ser Arg Ile Ala Gln Leu Leu Arg Asp Thr Phe Ser Ser Val Arg

1155

1160

1165

Gln Glu Leu Glu Ala Val Ala Gly Ala Val Leu Ser Ser Pro Gly Ser

1170

1175

1180

Ser Pro Gly Ala Val Gly Ala Glu Gln Thr Gln Ala Leu Leu Glu Gln

1185

1190

1195

1200

Tyr Ser Glu Leu Leu Leu Arg Ala Val Glu Arg Arg Met Glu Arg Lys

1205

1210

1215

Leu

【図面の簡単な説明】

【図1】 JNK3とKIAA0569（配列表の配列番号2）との相互作用をインシリコで予測した結果を示す図面である。

【図2】 JNK3とKIAA0569CT（KIAA0596のアミノ酸配列第639～1217番目のアミノ酸配列からなるペプチド）（配列表の配列番号1）とが結合することを示す図である。上図はKIAA0569CTのMBP-JNK3との結合を、下図は陰性コントロールであるMBPとの結合をフアー・ウエスタン法で検出した結果を示す。

【図3】 JNK3によるc-Junのリン酸化をKIAA0569CTが阻害することを示す図面である。レーン1および4は、JNK3によるc-Jun（1-79）のリン酸化反応に他の蛋白質を無添加のとき、レーン2および3はGSTをそれぞれ1 μ gおよび2 μ g、レーン5および6はGST-KIAA0596CTをそれぞれ1 μ gおよび2 μ g添加したときの結果を示す。矢頭はリン酸化されたc-Jun（1-79）を示す。

【書類名】 図面

【図 1】

>Score = 35.0

413 QPSPSGAAVNSSESLPPSSSVNDISSMSTDQ
1091 QPPPPEKTPNPMECTKPGAALSQDSAVSLEQ
QP P N E P S S Q

>Score = 25.9

130 FTPQKTL EE
262 YSLQQTLDE
Q TL E

>Score = 26.4

199 SDCTLKILDFGLARTAGTSF
386 SDKNLSIFDFSSGECVATMF
SD L I DF T F

>Score = 25.6

326 KLKASQARDLLSKML
242 KLLASASRDRLIHVL
KL AS RD L L

>Score = 25.2

316 SLFPADSEHNKLKASQARDLLSK
906 SLVPQERHEASLQAPSPGALLSR
SL P L A LLS

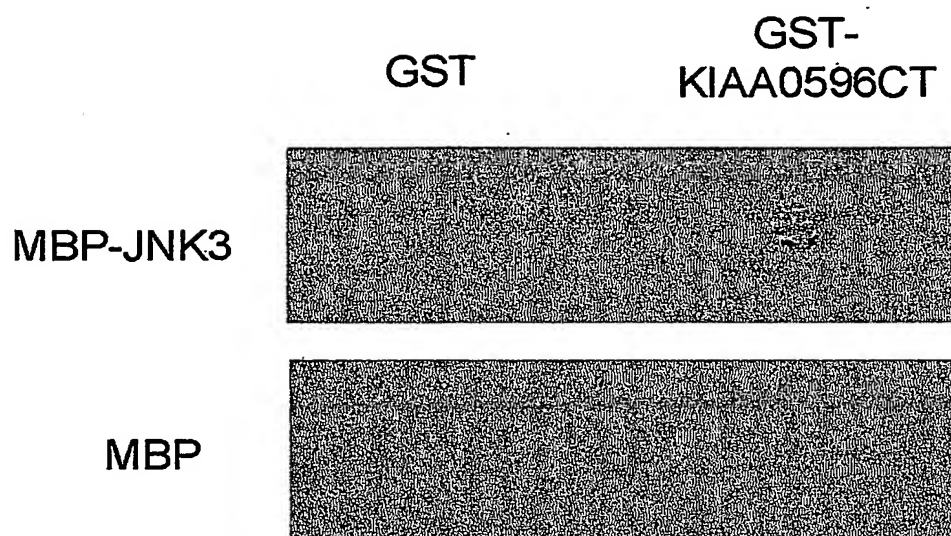
>Score = 25.9

387 IEEWKEL-IYKEVMNSEE
94 LDKWVELRVYPEVKDSNQ
W EL Y EV S

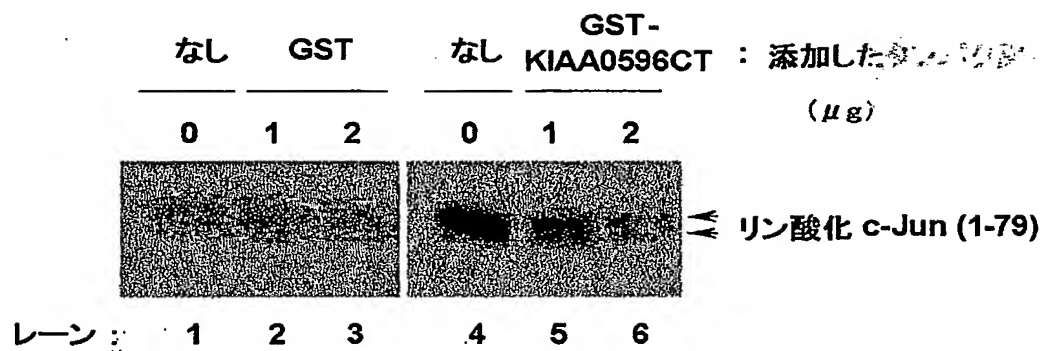
>Score = 26.7

437 SSMSTDQTLASDTD
480 SMLSPGPALSSDSD
S S L SD D

【図 2】



【図 3】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 JNK3シグナル経路の阻害物質を見い出し、JNK3シグナル経路の異常に基づく疾患、例えば細胞のアポトーシスに基づく神経変性疾患などの疾患、の防止および／または治療手段を提供すること。

【解決手段】 配列番号1のアミノ酸配列からなるペプチド(A)、JNK3と結合する下記ペプチド；ペプチド(A)の部分配列を有するペプチド；ペプチド(A)のアミノ酸配列において1個ないし数個のアミノ酸の変異を有するペプチド；ペプチド(A)と約70%以上の相同性を有するペプチド；上記ペプチドを含有するペプチド；によりJNK3によるc-Junのリン酸化を阻害することによる、c-Junの転写活性化能の抑制、これを利用したアポトーシス抑制、並びにポリグルタミン病やアルツハイマー病などの神経変性疾患の防止および／または治療、に用いる薬剤、医薬組成物およびその方法。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願2002-095486
受付番号	50200457261
書類名	特許願
担当官	第五担当上席 0094
作成日	平成14年 4月 1日

<認定情報・付加情報>

【提出日】	平成14年 3月29日
-------	-------------

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [500520628]

1. 変更年月日 2000年10月26日

[変更理由] 新規登録

住 所 千葉県千葉市美浜区中瀬1丁目3番地 幕張テクノガーデンD
17

氏 名 セレスター・レキシコ・サイエンシズ株式会社

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000002831]

1. 変更年月日	1990年 8月28日
[変更理由]	新規登録
住 所	東京都中央区日本橋3丁目14番10号
氏 名	第一製薬株式会社